

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
25 de Marzo de 2004 (25.03.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/024770 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K 16/18, 7/06, 7/08, G01N 33/68
- (74) Mandatario: SANZ SÁIZ, Gerardo; Director de OTRI - Universidad de Zaragoza, C/ Baltasar Gracián 1, Entlo., E-50005 Zaragoza (ES).
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2003/000422
- (81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Fecha de presentación internacional:
13 de Agosto de 2003 (13.08.2003)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P 0202094
12 de Septiembre de 2002 (12.09.2002) ES
- (71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*):
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA [ES/ES]; C/Baltasar Gracián 1, Entlo., E-50005 Zaragoza (ES).
- (72) Inventor; e
- (75) Inventor/Solicitante (*para US solamente*): SARASA BARRIO, Manuel [ES/ES]; C/ Baltasar Gracián 1, Entlo., E-50005 Zaragoza (ES).
- Publicada:
— con informe de búsqueda internacional
- Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: POLYCLONAL ANTIBODIES, PREPARATION METHOD THEREOF AND USE OF SAME

(54) Título: ANTICUERPOS POLICLONALES, MÉTODO DE PREPARACIÓN Y USO DE LOS MISMOS

(57) **Abstract:** The invention relates to polyclonal antibodies which specifically recognise, and have a strong affinity with, the two most significant amyloid peptides, Ab40 and Ab42. The invention also relates to the use thereof in assessing drugs which activate the degradation of amyloid peptides characteristic of Alzheimer's disease as well as drugs which inhibit the formation of same.

(57) **Resumen:** Anticuerpos policlonales que reconocen específicamente y con gran afinidad a los dos péptidos amiloides más importantes, el Ab40 y el Ab42, así como a su empleo en la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides característicos de la enfermedad de Alzheimer como de fármacos inhibidores de su formación.



WO 2004/024770 A1

Anticuerpos policlonales, método de preparación y uso de los mismos.

La presente invención se refiere a anticuerpos
5 policlonales que reconocen específicamente y con gran afinidad a los dos péptidos amiloides más importantes, el A β 40 y el A β 42, así como a su empleo en la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides característicos
10 de la enfermedad de Alzheimer como de fármacos inhibidores de su formación. Del mismo modo, pueden ser útiles para la valoración de la actividad de las enzimas implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de
15 las enzimas implicadas en la degradación de los mismos, así como de la valoración del nivel de expresión de los genes implicados en toda la maquinaria de eventos que conducen al depósito y formación de placas amiloides, lesiones características de los cerebros de pacientes
20 que sufren la enfermedad de Alzheimer.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Se conocen determinados factores acerca de los
25 fenómenos bioquímicos y metabólicos asociados a la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Dos cambios morfológicos e histopatológicos observados en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer son marañas neurofibrilares (MNF) y depósitos
30 amiloides.

Las marañas neurofibrilares intraneuronales están también presentes en otras enfermedades degenerativas, pero la presencia de depósitos de amiloide tanto en los
35 espacios interneuronales (placas neuríticas) como

en la microvasculatura circundante (placas vasculares) parece ser característica del Alzheimer. De éstas, las placas neuríticas parecen ser las más características (Price, D.L. y col. , Drug Development
5 Research (1985) 5:59-68).

El componente principal de estas placas amiloides es un péptido de 40-42 aminoácidos denominado péptido amiloide A β 4.

10

El péptido amiloide A β 4 es un polipéptido originado por proteólisis a partir de unas glucoproteínas de membrana denominadas proteínas precursoras del péptido amiloide A β 4 (β APP). Estando estas proteínas precursoras del
15 péptido amiloide constituidas por 695 a 770 aminoácidos, siendo todas ellas producidas por el mismo gen.

Se han identificado dos variantes principales del
20 péptido amiloide A β 4, el péptido A β 40 y el A β 42, de 40 y 42 aminoácidos respectivamente, que presentan una distribución tisular diferente en condiciones tanto fisiológicas como patológicas.

25 Nosotros hemos clonado y secuenciado el gen de la β APP en el pollo y hemos demostrado que es prácticamente idéntico al gen humano, pues produce β APPs con una enorme homología, del orden del 95%, a las de la especie humana, y el péptido A β 4, característico de la
30 enfermedad de Alzheimer, es idéntico al humano. Además, el embrión de pollo procesa a las β APPs de tal forma que se produce péptido A β 4, debido a la acción de unas enzimas proteolíticas que provocan la proteólisis de las β APPs en un sitio clave para producir A β 4, la
35 enzima proteolítica que corta las β APPs para producir

A β 4 es denominada β -secretasa.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

- 5 La presente invención proporciona anticuerpos policlonales, capaces de reconocer específicamente mediante cualquier técnica inmunológica convencional (western blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, ELISA, RIA, ...) de la presencia de los péptidos
- 10 amiloides A β 40 y A β 42, obtenidos por inmunización de mamíferos, preferiblemente conejos, con una proteína conjugada con un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por
- 15 eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína.
- 20 En una realización particular, el péptido corresponde a SEQ ID NO 1, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 2, opcionalmente alargado por
- 25 adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 3, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En
- 30 otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 4, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. Aunque la eliminación de los restos aminoacídicos terminales no elimina la actividad
- 35 específica, los péptidos preferidos son los de SEQ ID

NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

La provisión de cualquiera de los péptidos,
substancialmente puros, antes mencionados es también
5 parte de la presente invención.

Esta invención también proporciona un método para la
obtención de los anticuerpos policlonales antes
mencionados por inmunización de mamíferos,
10 preferiblemente conejos, con una proteína conjugada a
un péptido seleccionado a partir de un grupo que
consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ
ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los
restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-
15 terminal, y opcionalmente alargados por adición de los
restos de aminoácido apropiados para conjugar la
proteína.

Según una forma de realización preferida de realización
20 de la presente invención, la proteína utilizada para su
conjugación con el péptido es la hemocianina de lapa
(KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

En una realización aún más preferida de la presente
25 invención, los mamíferos utilizados, para su
inmunización con la proteína conjugada al péptido, son
conejos.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se
30 proporciona un nuevo método para la valoración tanto de
fármacos activadores de la degradación de los péptidos
amiloides característicos de la enfermedad de
Alzheimer, como de fármacos inhibidores de su
producción, mediante el uso de los anticuerpos
35 policlonales descritos anteriormente.

Del mismo modo, el método sirve también para valorar la actividad de las enzimas (proteasas) implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de los mismos.

Esta invención también proporciona un método para la detección de la presencia o ausencia de los péptidos amiloides A β 40 y A β 42 en una muestra, empleando el embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

Según una realización preferida de la presente invención, se proporciona un nuevo método para la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides característicos de la enfermedad de Alzheimer, como de fármacos inhibidores de su producción, mediante el uso del embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, se proporciona un nuevo método para valorar la actividad de las enzimas (proteasas) implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de los mismos, mediante el uso del embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

El método consiste en la inoculación del fármaco en el huevo embrionado del pollo, ya por simple goteo sobre

el propio embrión o alguna de sus membranas, ya por inyección en el vitelo (si el embrión es joven) o saco vitelino (si el embrión es más mayor), en el saco amniótico, en el saco alantoideo (en embriones de
5 más de 6 días de incubación) o en el interior del propio embrión y, tras el tiempo adecuado de incubación, se extrae el embrión y/o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios y se analiza la cantidad de péptidos amiloides, característicos de la
10 enfermedad de Alzheimer, mediante las técnicas convencionales de laboratorio para la cuantificación de péptidos y proteínas como western blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación , ELISA, RIA, HPLC, etc.

15

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

20

Ejemplo 1.

Acoplamiento de los péptidos a hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin)

25 Los péptidos fueron acoplados a la proteína hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin), vía n-terminus, utilizando el agente acoplante glutaraldehído. Para lo cual se activó la proteína KLH en solución de buffer borato pH 10. A continuación se
30 añadió el péptido sintético y lentamente se añadió la solución de glutaraldehído 0.3% mientras se agitaba a temperatura ambiente. Tras la adicción de glicina 1M para bloquear el glutaraldehído no reaccionante, se dializó el conjugado péptido-proteína frente a 3 litros
35 de buffer borato pH 8.5 a temperatura de 4 °C. El

conjugado péptido-KLH se almacenó a 4 °C.

Ejemplo 2.

Generación de los anticuerpos policlonales.

- 5 Los cuatro anticuerpos policlonales fueron generados por inmunización de conejos New Zealand White contra los cuatro péptidos acoplados a KLH que se utilizaron como inmunógeno.
- 10 Cada inmunógeno se inyectó en dos conejos, realizándose cinco inyecciones: la primera inyección intradérmica del conjugado péptido-KLH en PBS y emulsionados en adyuvante completo de Freund y cuatro más intramusculares, a modo de dosis de recuerdo en los
- 15 días 14, 28, 49 y 80, del mismo conjugado péptido-KLH en PBS pero esta vez emulsionados en adyuvante incompleto de Freund, realizándose la sangría de control a los 90 días para detectar la presencia de los anticuerpos.

20

Ejemplo 3.

Purificación de los anticuerpos por afinidad.

- Tras la recogida de sangre, se separó el suero y se
- 25 prepurificó mediante desalado y posteriormente se purificaron los anticuerpos por afinidad en una matriz compuesta por 1,5 ml de material EMD-Epoxy activated (Merck) a la que se añadió 5mg del correspondiente péptido. Las fracciones purificadas se estabilizaron en
- 30 0.1% de BSA (Sigma) y se conservaron a 4 °C, pudiéndose añadir glicerol 20-50% como crioprotector.

Ejemplo 4.

Titulación del anticuerpo por ELISA.

35

Tras la purificación por afinidad se determinó el título del anticuerpo por ELISA. Para ello se puso el antígeno en una placa ELISA Maxi Sorb de Nunc a razón de 50ng/50µl en PBS pH 7, y se detectó el anticuerpo con anti-IgG de burro conjugada con fosfatasa alcalina, utilizando como sustrato p-nitrofenil fosfato (PNPP) en dietanolamina con 5mM MgCl₂, pH 9.6 y revelado a las 2 horas.

En conclusión, los anticuerpos se generaron empleando los diferentes péptidos sintéticos descritos anteriormente acoplados a KLH. Estos péptidos sintéticos contienen un número muy pequeño de aminoácidos, lo cual les hace muy adecuados para la producción en cadena de anticuerpos homogéneos, con epítomos predefinidos.

Lista de secuencias.

SEQ ID NO 1	LVFFAEDV
SEQ ID NO 2	GLMVGGVV
SEQ ID NO 3	GLMVGGVVIA
SEQ ID NO 4	RHDSGYEVHHQK

En esta solicitud los aminoácidos se abrevian utilizando los códigos de una letra aceptados en el campo, en la forma que se muestra a continuación:

A= Ala= alanina,
C= Cys= cisteína,
D= Asp= ácido aspártico,
E= Glu= ácido glutámico,
F= Phe= fenilalanina,
G= Gly= glicina,
H= His= histidina,

I= Ile= isoleucina,
K= Lys= lisina,
L= Leu= leucina,
M= Met= metionina,
5 N= Asn= asparagina,
P= Pro= prolina
Q= Gln= glutamina,
R= Arg= arginina,
S= Ser= serina,
10 T= Thr= treonina,
V= Val= valina,
W= Trp= triptofano,
Y= Tyr= tirosina,

15 La información relativa a la identificación de las
secuencias peptídicas, descritas en la presente
invención, que se acompaña a la presente memoria en
formato legible por ordenador, es idéntica al listado
de secuencias que se presenta acompañando a la memoria.

20

NUMERO DE SECUENCIAS: 4

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 1:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

25

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

30

SEQ ID NO 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val

1

5

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 2:

35

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

10

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

5 DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 2

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

1

5

10 INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 3:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 10

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

15 FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

1

5

10

20

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 4:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 12

TIPO: aminoácido

25 TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

30

1

5

10

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo policlonal para el reconocimiento específico de las formas principales de péptido beta amiloide, A β 40 y A β 42, obtenible por inmunización de mamíferos con una proteína conjugada a un péptido seleccionado entre el grupo formado por:
 - el péptido de SEQ ID NO 1, el péptido de SEQ ID NO 2, el péptido de SEQ ID NO 3, el péptido de SEQ ID NO 4;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1, de SEQ ID NO 2, de SEQ ID NO 3 o de SEQ ID NO 4;
 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
2. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1, caracterizado porque la inmunización se realiza con un péptido seleccionado entre el grupo constituido por:
 - el péptido de SEQ ID NO 1;
 - los péptidos con una secuencia resultante de eliminar los restos de aminoácido N-terminal y/o C-terminal de SEQ ID NO 1;
 - y los péptidos resultantes de añadir a cualquiera de las secuencias precedentes, los restos de aminoácido necesarios para la conjugación de la proteína.
3. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1, caracterizado porque la inmunización se realiza

con un péptido seleccionado entre el grupo
constituido por:

- el péptido de SEQ ID NO 2;
 - los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 2;
 - y los péptidos resultantes de añadir a
cualquiera de las secuencias precedentes,
los restos de aminoácido necesarios para la
conjugación de la proteína.
4. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1,
caracterizado porque la inmunización se realiza
con un péptido seleccionado entre el grupo
constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 3;
 - los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 3;
 - y los péptidos resultantes de añadir a
cualquiera de las secuencias precedentes,
los restos de aminoácido necesarios para la
conjugación de la proteína.
5. Anticuerpo policlonal según la reivindicación 1,
caracterizado porque la inmunización se realiza
con un péptido seleccionado entre el grupo
constituido por:
- el péptido de SEQ ID NO 4;
 - los péptidos con una secuencia resultante de
eliminar los restos de aminoácido N-terminal
y/o C-terminal de SEQ ID NO 4;
 - y los péptidos resultantes de añadir a
cualquiera de las secuencias precedentes,
los restos de aminoácido necesarios para la

conjugación de la proteína.

- 5 6. Anticuerpo policlonal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 5, caracterizado porque la proteína es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).
- 10 7. Anticuerpo policlonal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 6, caracterizado porque los mamíferos son conejos.
- 15 8. Péptido sustancialmente puro caracterizado por tener una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo definido en la reivindicación 1.
9. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 2.
- 20 10. Péptido según la reivindicación 9, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 1.
- 25 11. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 3.
12. Péptido según la reivindicación 11, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 2.
- 30 13. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 4.
- 35 14. Péptido según la reivindicación 13, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 3.

15. Péptido según la reivindicación 8, caracterizado porque la secuencia se selecciona entre el grupo definido en la reivindicación 5.
- 5
16. Péptido según la reivindicación 15, caracterizado porque la secuencia es SEQ ID NO 4.
- 10
17. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 8 a 16, para la obtención de anticuerpos policlonales mediante conjugación a una proteína e inmunización de mamíferos.
- 15
18. Uso según la reivindicación 17, caracterizado porque la proteína es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).
- 20
19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 17 a 18, caracterizado porque los mamíferos son conejos.
- 25
20. Método de obtención anticuerpos policlonales para el reconocimiento específico de las formas principales de péptido beta amiloide, A β 40 y A β 42, caracterizado porque se inmunizan mamíferos con una proteína conjugada a un péptido seleccionado entre el grupo definido en la reivindicación 1.
- 30
21. Método según la reivindicación 20, caracterizado porque la proteína utilizada es la hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).
- 35
22. Método según cualquiera de las reivindicaciones

anteriores 20 a 21, caracterizado porque los mamíferos son conejos.

5 23. Método de detección de la presencia o ausencia de los péptidos amiloides A β 40 y A β 42 en una muestra, caracterizado porque comprende poner en contacto dicha muestra con un anticuerpo definido como en la reivindicación 1, y detectar la presencia o ausencia del complejo formado por
10 dichos péptidos amiloides y dicho anticuerpo.

24. Método de valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides, como de fármacos inhibidores de su
15 producción, mediante el uso de los anticuerpos policlonales descritos en la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea el huevo embrionado del pollo como modelo animal de ensayo.

20 25. Uso del huevo embrionado de pollo como modelo animal de ensayo para la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides, como de fármacos inhibidores
25 de su producción, mediante el empleo de anticuerpos policlonales como marcadores de la presencia o ausencia de dichos péptidos amiloides.

30 26. Uso según la reivindicación 25, caracterizado porque los anticuerpos policlonales utilizados son los definidos en la reivindicación 1.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zaragoza
<120> Anticuerpos policlonales, método de preparación y uso de los mismos.
<130>
<160> 4
<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Síntesis Química
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(8)
<223>
<400> 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Síntesis Química
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(8)
<223>
<400> 2

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1 5

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Síntesis Química
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1) .. (10)
<223>
<400> 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Síntesis Química
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1) .. (12)
<223>
<400> 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 03/00422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ C07K 16/18, C07K 7/06, C07K 7/08, G01N 33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C07K, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPA, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 8906242 A1 (THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION & UNIVERSITY OF ROCHESTER) 13.07.1989.	1,2,5-10, 15-23
Y	The whole document.	24-26
Y	DOMÍNGUEZ, L., GARZA, V., LACOSTA, A.M., SORRIBAS, V., SARASA, M. Developmental spatiotemporal expression of Alzheimer beta - APP isoforms in the chick embryo. Int. J. Dev. Biol. 2001. Vol. 45 (S1): Pages S73-S74.	24-26
X	CITRON, M., DHIEL, T.S., GORDON, G., BIERE, A.L., SEUBERT, P., SELKOE, D.J. Evidence that the 42- and 40- amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta- amyloid precursor protein by different protease activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. November 1996, Vol. 93, pages 13170-13175.	1,3,4,8, 11-14, 17, 20, 23

☐

Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 November 2003 (28.11.2003)

Date of mailing of the international search report

17 December 2003 (17.12.2003)

Name and mailing address of the ISA/

SPTO

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 03/00422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8906242 A1	13.07.1989	AU 3287989 A	01.08.1989
		JP 3502455 T	06.06.1991
		US 5231000 A	27.07.1993
		EP 0440619 B1	24.01.1996
		DE 3854944 G	07.03.1996
		CA 1339014 C	25.03.1997
<hr/>			

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 03/00422

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C07K 16/18, C07K 7/06, C07K 7/08, G01N 33/68

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

CIP⁷ C07K, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPA, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 8906242 A1 (THE MCLEAN HOSPITAL CORPORATION & UNIVERSITY OF ROCHESTER) 13.07.1989.	1,2,5-10,
Y	Todo el documento.	15-23 24-26
Y	DOMÍNGUEZ, L., GARZA, V., LACOSTA, A.M., SORRIBAS, V., SARASA, M. Developmental spatiotemporal expression of Alzheimer beta - APP isoforms in the chick embryo. Int. J. Dev. Biol. 2001. Vol. 45 (S1): Páginas S73-S74.	24-26
X	CITRON, M., DHIEL, T.S., GORDON, G., BIERE, A.L., SEUBERT, P., SELKOE, D.J. Evidence that the 42- and 40- amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta- amyloid precursor protein by different protease activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Noviembre 1996, Vol. 93, páginas 13170-13175.	1,3,4,8, 11-14, 17, 20, 23

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

28 Noviembre 2003 (28.11.2003)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

17 DIC 2003 17. 12. 03

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la

Búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

E. Relaño Reyes

N° de teléfono + 34 91 3493047

Información relativa a miembros de familias de patentes

PCT/ ES 03/00422

Formulario PCT/ISA/210 (anexo_familia de patentes) (julio 1998)

1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zaragoza
 <120> Anticuerpos policlonales, método de preparación y uso de los mismos.
 <130>
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.1

 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Síntesis Química
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(8)
 <223>
 <400> 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val
 1 5

<210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Síntesis Química
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(8)
 <223>
 <400> 2

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 1 5

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Síntesis Química
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1) .. (10)
<223>
<400> 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Síntesis Química
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1) .. (12)
<223>
<400> 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10